



Trabajo Fin de Grado

Modulación de las propiedades mecánicas de hidrogeles

Autor

Francisco Javier Palomo Agorreta

Director

Carlos Sánchez Somolinos

Departamento de Física de la Materia Condensada
ICMA (CSIC-Universidad de Zaragoza)

Facultad de Ciencias / Departamento de Física de la Materia Condensada

2016

Índice

I. Introducción	2
II. Materiales y técnicas experimentales.....	7
II. 1.- Materiales y preparación de mezclas	7
II. 1. A.- Materiales	7
II. 1. B.- Preparación de mezclas	8
II. 2.- Técnicas experimentales	9
II. 2. A.- FTIR.....	9
II. 2. B.- Ensayos de hinchamiento	9
II. 2. C.- Ensayos mecánicos.....	10
II. 2. D.- Preparación de muestras anisótropas	10
III. Resultados y discusión	12
III. 1.- Reacción en dos etapas.....	12
III. 1. A.- Primera etapa	12
III. 1. B.- Segunda etapa.....	13
III. 2.- Seguimiento de la reacción	14
III. 3.- Hinchamiento.....	17
III. 4.- Ensayos mecánicos de hidrogeles.....	18
III. 5.- Propiedades anisótropas de hidrogeles esctructurados.....	22
IV. Conclusiones	23
V.- Bibliografía	25

I. Introducción

La ingeniería de tejidos es el término por el que se conoce a la producción artificial de tejido biológico. Es un área de estudio interdisciplinar, puesto que enlaza conocimientos de bioingeniería, bioquímica, ciencia de materiales y biofísica. El objetivo de esta disciplina es conseguir regenerar tejidos dañados a su estado funcional a partir de células del propio paciente. Este matiz es de gran importancia, puesto que reduce el rechazo inmune producido por el organismo al introducir células, tejidos u organismos ajenos al paciente. El crecimiento de estos cultivos celulares tiene por objetivo alcanzar, al finalizar el proceso, un tejido que tenga características similares que el tejido original. Para ello se debe hacer uso de un andamiaje o *scaffold* sobre el cual las células puedan proliferar de manera adecuada. El andamiaje está compuesto de un material (biológico o artificial) que cumple una función estructural y debe satisfacer una serie de requisitos muy específicos. En primer lugar su morfología debe ser capaz de guiar el crecimiento celular de tal forma que las nuevas células se desarrollen en la misma disposición que la del tejido al que pretenden sustituir. A su vez deberá tener unas propiedades mecánicas similares a las del tejido original (ver ilustración 1), siendo capaz de soportar distintos tipos de esfuerzos (isótropos o anisótropos) propios de cada tejido u órgano.

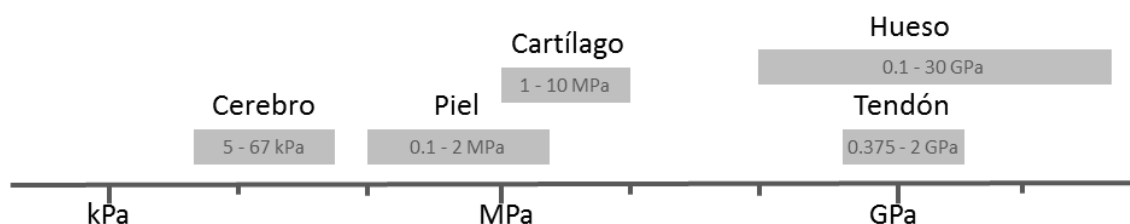


Ilustración 1. Módulo de Young de distintos tejidos vivos. Adaptado de [Saltzman., 2004]

En algunas ocasiones es deseable que estos andamiajes sean biodegradables y por lo tanto debe tenerse en cuenta su tiempo de degradación. Éste deberá ser lo suficientemente lento como para dar tiempo a las células a crecer correctamente sobre él pero a su vez lo suficientemente rápido para que el tejido en desarrollo pueda reemplazarlo. En cualquiera de los casos siempre debe seleccionarse un material que sea compatible con el organismo, lo que se conoce como biomaterial.

Los biomateriales son sustancias naturales o artificiales diseñadas para interactuar con sistemas biológicos. Al igual que la ingeniería de tejidos, la ciencia de los biomateriales es un campo multidisciplinar. Desde el desarrollo de la idea hasta su implementación para la aplicación en pacientes se requieren profesionales e investigadores en bioingeniería, química, física, medicina, etc. Debido a la gran gama de materiales empleados en el estudio de los biomateriales generalmente se realiza una división, por un lado se encontraría el campo de la “sustitución de tejidos duros”, que abarcaría a los especializados en metales y cerámicas, y por otro lado el campo de la “sustitución de tejidos blandos”, que estarían enfocados en el estudio de los polímeros [Ratner et al., 2004].

Los polímeros son moléculas (generalmente en forma de cadena) caracterizadas por presentar un alto peso molecular, también conocidas como macromoléculas. Un polímero está compuesto por la repetición de varias subunidades conocidas como monómeros. Dependiendo de su origen se clasifican en naturales (caucho, celulosa, ADN, etc.) o sintéticos (poliestireno, poliuretano, nailon, etc.). Los de origen sintético brindan la posibilidad de ser alterados químicamente para ajustar sus propiedades a los valores deseados y de esta forma lograr adecuarse mejor al propósito para el que se diseñaron. Las principales ventajas en el uso de polímeros como biomateriales radican en su facilidad de procesamiento y su enorme versatilidad, pudiendo modular un gran abanico de propiedades físicas y químicas, así como la estructuración o la degradación del material.

La degradación es un aspecto de crucial importancia en la selección de un polímero, ya que durante el proceso de degradación el material sufre un cambio en sus propiedades y puede generar productos indeseados que causen una respuesta adversa en el organismo. Dependiendo de si sufren o no degradación, existen dos tipos de polímeros: los bioestables, que no se degradan en condiciones fisiológicas y por lo tanto su uso se enfoca en aplicaciones a largo plazo (implantes); y los biodegradables, que sufren degradación en la cadena polimérica y resultan atractivos en aquellas aplicaciones en las que el material debe mantener su funcionalidad sólo un período de tiempo.

Dentro de los materiales poliméricos biocompatibles, los hidrogeles son sistemas de gran interés en biomedicina por su similitud con los diferentes tejidos vivos [Zhu, 2012; Killion et al., 2011]. Los hidrogeles son redes entrecruzadas de polímeros hidrófilos hinchadas por agua. Se caracterizan por ser materiales blandos con un alto contenido en agua, similar a tejidos blandos. Tienen buenas propiedades biocompatibles y por ello una amplia aplicación en muchos campos como el cultivo de células o implantes biomédicos. Cuando una red polimérica entrecruzada se pone en contacto con una solución líquida o un fluido biológico comienza a absorber debido a la compatibilidad entre las cadenas poliméricas y el agua. A esta fuerza de hinchamiento se opone la fuerza de retracción inducida por el entrecruzamiento de la red. Cuando estas dos fuerzas se igualan el sistema alcanza el equilibrio y el material deja de absorber [Barbucci, 2009].

A su vez los hidrogeles presentan propiedades mecánicas altamente modulables, lo que permite definir su rango de aplicación. Por ejemplo un hidrogel artificial para un cartílago debe soportar un esfuerzo de compresión de entre 0.5 y 10 MPa [Park et al., 2008; Yang, 2012]. Además se conoce que las células de los tejidos no sólo se adhieren a su ambiente microscópico, sino que también tiran de él, por lo que la rigidez y elasticidad de un hidrogel es un factor de gran importancia si se pretende generar un entorno biomimético [Discher et al., 2005]. Cambios en elasticidad del sustrato influyen todo tipo de comportamientos celulares: locomoción, adhesión, proliferación e incluso la propia diferenciación de células madre [Tse et al., 2010]. Respecto a esto último, el equipo de Adam Engler comprobó que la elasticidad del microambiente celular ejerce una gran influencia en la diferenciación de células madre [Engler et al., 2006]. Queda por tanto patente la relevancia que tiene el control de las propiedades mecánicas de los hidrogeles que se pretenden usar en aplicaciones biológicas.

El control de las propiedades en un hidrogel se puede realizar de varias formas. La más simple de ellas consiste en la alteración de la composición monomérica, por ejemplo, intercambiando grupos acrilato por metacrilato se consigue aumentar la dureza del material. Otra manera de controlar las propiedades mecánicas es modificando el nivel de entrecruzamiento de la red polimérica. Se ha comprobado que la rigidez del material está fuertemente ligada al grado de entrecruzamiento de la red, aumentando al incrementar el grado de entrecruzamiento [Anseth et al., 1995]. Una tercera opción es modificar las condiciones en las que se genera el polímero, tales como la temperatura, pH, tiempo de reacción, cantidad de disolvente, etc.

Al tratarse de redes poliméricas, un aspecto importante en la generación de hidrogeles es el tipo de entrecruzamiento que la red presenta. Existen por un lado los hidrogeles de entrecruzamiento físico, en los que la unión entre las cadenas poliméricas se realiza mediante enlaces iónicos, cristalización o puentes de hidrógeno. Por otro lado se tienen los hidrogeles de entrecruzamiento químico, caracterizados por presentar enlaces covalentes entre sus cadenas poliméricas [Datta, 2007].

De entre las diversas técnicas de creación de polímeros sintéticos la fotopolimerización radicalaria en cadena es una de las más empleadas (ver ilustración 2). Esta técnica química requiere de un elemento adicional llamado fotoiniciador. Los fotoiniciadores son sustancias estables que al ser irradiadas con una longitud de onda determinada generan radicales libres (electrones desapareados). Cada uno de estos radicales libres puede adicionarse a un monómero, convirtiéndolo en una especie radicalaria capaz de reaccionar con otros monómeros. Cuando esto ocurre, el monómero radicalario se une con un monómero libre y el radical pasa al extremo del último monómero añadido. De esta forma se generan cadenas de monómeros, quedando siempre en el extremo de la cadena el radical libre capaz de seguir reaccionando. Si los monómeros poseen más de un grupo funcional (grupo capaz de reaccionar al radical libre) no se generan cadenas lineales sino que se produce entrecruzamiento (ver ilustración 3). El proceso termina cuando el radical del extremo reacciona con una especie distinta al monómero, perdiendo su capacidad reactiva.

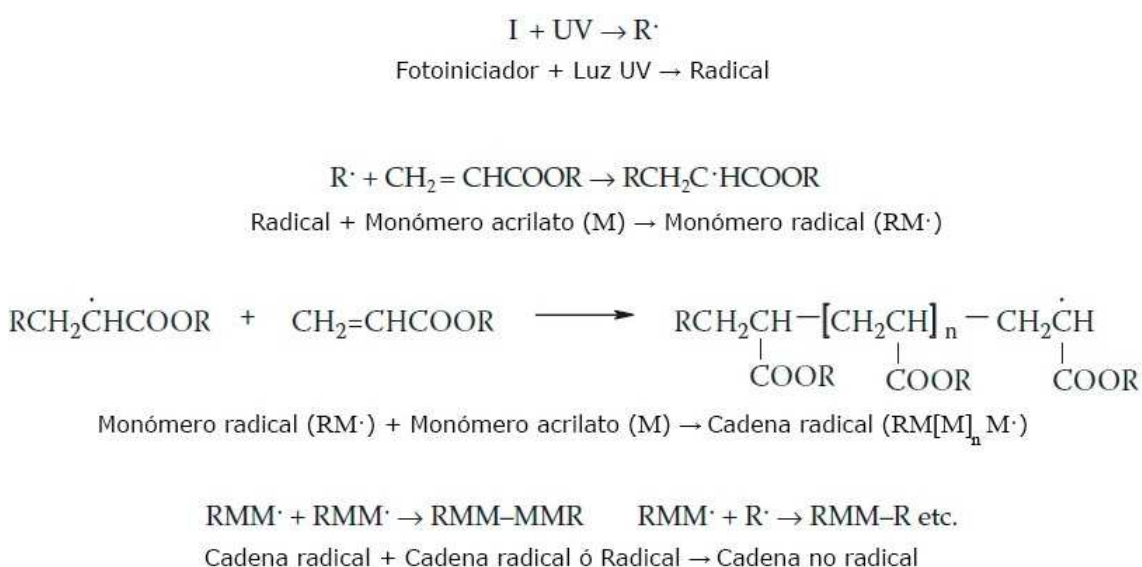


Ilustración 2. Esquema de la fotopolimerización radicalaria en cadena para el caso de monómeros de acrilato. Adaptado de [Green, 2010].

Esta técnica de polimerización resulta atractiva debido a su bajo consumo energético y rapidez. También permite tener un control espacial y temporal de la reacción, ya que se desencadena mediante un proceso externo, pudiéndose elegir dónde y cuándo se quiere irradiar el material fotopolimerizable. Esto abre la posibilidad de conseguir polímeros con estructuras geométricas controladas mediante diferentes técnicas de estructuración.

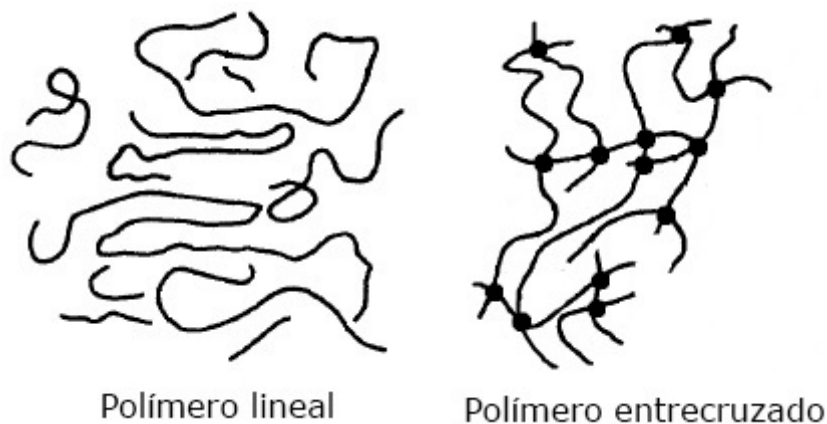


Ilustración 3. Esquema conceptual de un polímero lineal y otro entrecruzado. Adaptado de [Sperling, 2006].

De entre la variedad de materiales que se pueden emplear para la formación de hidrogeles el PEGDA (Polietilenglicol diacrilato) ha adquirido una gran relevancia. El polietilenglicol (PEG), precursor del PEGDA, es un polímero soluble en agua, hidrófilo y biocompatible. Además no es tóxico para pesos moleculares por encima de los 400 *kDa* y se elimina fácilmente por el riñón [Nemir et al., 2009]. Si los grupos hidroxil se sustituyen por grupos acrilato, se obtiene el PEGDA (ver ilustración 4).

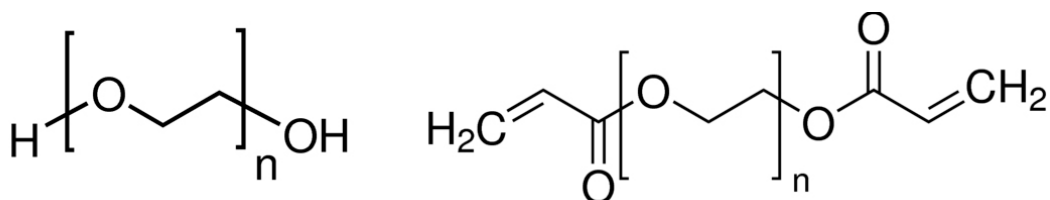


Ilustración 4. Moléculas de PEG (izquierda) y PEGDA (derecha).

La ventaja del PEGDA es su capacidad de crear redes poliméricas por entrecruzamiento, así como la posibilidad de modulación de sus propiedades mecánicas variando su peso molecular o la concentración de polímero. Este material actualmente se emplea en una gran cantidad de aplicaciones (lentes de contacto, encapsulamiento de fármacos, membranas en biosensores, etc.) debido a su carácter biocompatible y sus buenas propiedades mecánicas [Datta, 2005].

Mediante el control del peso molecular del monómero de PEGDA empleado es posible obtener hidrogeles con diferentes módulos elásticos [Nemir et al., 2009]. Existe una serie de pesos moleculares de PEGDA disponibles en el mercado, pero esta oferta es limitada y la preparación de este tipo de materiales requiere de síntesis especializadas. Más importante si cabe, los hidrogeles de PEGDA son materiales considerados bioestables en períodos cortos de tiempo, sufriendo sólo degradación hidrolítica *in vivo* muy lenta en períodos largos del orden de meses

o años [Browing et al., 2012]. Esta propiedad limita su aplicabilidad en ingeniería de tejidos, donde en ocasiones se buscan perfiles de degradación de semanas, de modo que se necesita modificar la cadena de PEG con grupos susceptibles de biodegradación. Esto se ha soslayado, por ejemplo, mediante la síntesis de macromonómeros lineales con grupos acrilato en los extremos y estructura tipo copolímero bloque con bloques de PEG y polilactida (PLA). Estos macromonómeros pueden ser fotopolimerizados dando lugar a hidrogeles hidrolíticamente degradables [Clapper et al., 2007]. Otra aproximación para promover la biodegradación de hidrogeles derivados del PEG es hacer reaccionar PEGDA con moléculas con grupos tiol mediante adición de Michael para crear una red con enlaces tioeter (sulfuro) próximo al enlace éster del acrilato [Bounds et al., 2011]. Esta proximidad favorece la hidrólisis del grupo éster. Se han observado pérdidas de masa del hidrogel de más de la mitad de su peso inicial en unos pocos días [Rydholm et al., 2006; Browning et al., 2012].

Recientemente se ha propuesto, fuera del ámbito de los hidrogeles, la preparación de redes poliméricas a partir de monómeros acrilato y tiol multifuncionales mediante un proceso de dos etapas (*two-stage*) [Nair et al., 2012]. Para ello se han estudiado mezclas multifuncionales con exceso de acrilato en sistemas tiol-acrilato. En una primera etapa se produce una red polimérica mediante adición de Michael (ver ilustración 5) que procede hasta que se consume el tiol (reacción autolimitante), quedando grupos acrilato no reaccionados en la red. En una segunda etapa los grupos acrilato se hacen reaccionar mediante fotopolimerización, resultando en una red polimérica entrecruzada de módulo elástico superior al del sistema formado en la primera etapa.

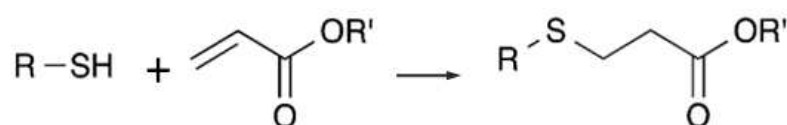


Ilustración 5. Adición de Michael entre grupos tiol y grupos acrilato (primera etapa).

En el presente trabajo se propone el empleo de la técnica de dos etapas para formar hidrogeles basados en composiciones monoméricas de diacrilato (PEGDA) y ditiol (EDDET) con exceso de acrilato. La presencia del tiol en la cadena polimérica facilitará la degradación del material. Mediante el control de la estequiometría se busca poder generar en la primera etapa cadenas lineales de longitud deseada y controlar así las propiedades mecánicas del material final (ver ilustración 6).

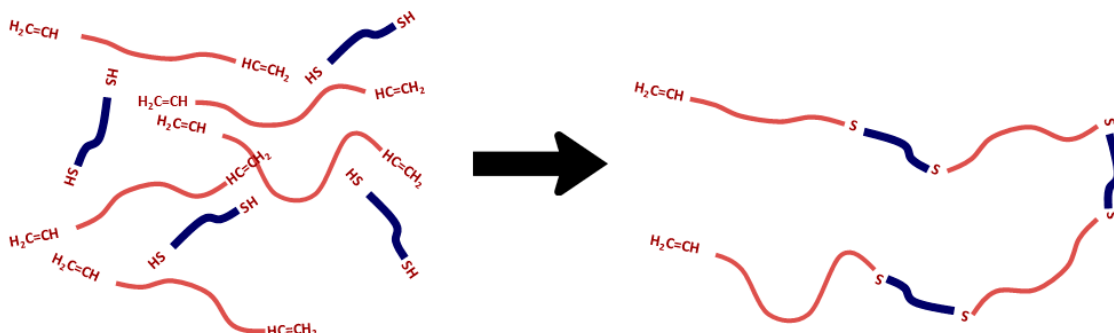


Ilustración 6. Primera etapa: las moléculas de PEGDA y EDDT reaccionan mediante el mecanismo de adición de Michael formando cadenas lineales con grupos funcionales acrilato en los extremos.

Se emplean composiciones con exceso de acrilato para garantizar que estadísticamente las cadenas generadas posean grupos acrilato en sus extremos. De esta forma haciendo uso de un fotoiniciador adecuado se pueden fotopolimerizar los grupos acrilato formando una red polimérica entrecruzada (ver ilustración 7) en la segunda etapa.

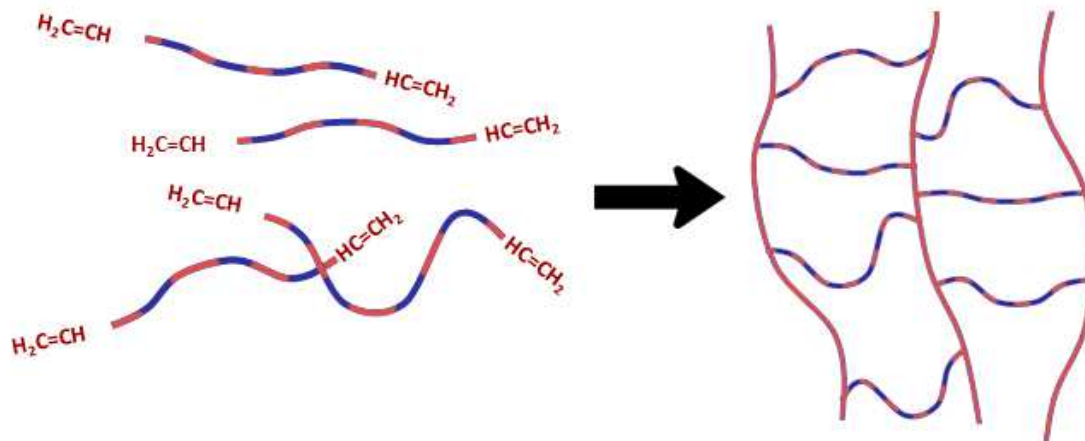


Ilustración 7. Segunda etapa: las cadenas lineales formadas en la primera etapa se fotopolimerizan generando una red entrecruzada.

En el marco de este trabajo se hará un seguimiento de la reacción (dos etapas) mediante FTIR, se caracterizará el hinchamiento y las propiedades mecánicas de los materiales obtenidos.

Además de la magnitud del módulo elástico, también se pretenden conseguir propiedades anisótropas, ya que los tejidos vivos presentan este tipo de comportamiento [Engelmayr et al., 2008]. Para ello se requiere de la estructuración del material o el uso de materiales compuestos. En estos últimos es necesaria una buena adhesión entre los distintos materiales para que las estructuras generadas mantengan su integridad y propiedades. En este sentido el uso de PEGDA de distintos pesos moleculares y propiedades mecánicas resulta muy atractivo para obtener materiales compuestos [Nemir et al., 2009]. A partir de los materiales desarrollados en nuestro trabajo pueden prepararse materiales estructurados con respuesta mecánica anisótropa.

II. Materiales y técnicas experimentales

II. 1.- Materiales y preparación de mezclas

II. 1. A.- Materiales

Como se ha mencionado en la introducción, se emplea una variante del polietilenglicol conocida como polietilenglicol diacrilato (PEGDA). La molécula de PEGDA es una larga cadena

lineal de poliéter con grupos acrilato en ambos extremos. Nosotros empleamos la de peso atómico 700 Da.

La segunda molécula que se emplea en la primera etapa de la reacción para generar las cadenas lineales es el 2,2'-(Ethilenedioxi) dietanetioli (EDDET). Esta molécula es una pequeña cadena lineal de peso atómico 182.3 Da que posee grupos tiol a ambos extremos.

También se hace uso de una amina terciaria como catalizador de la adición de Michael en la primera etapa, la trietilamina (TEA).

Para iniciar el proceso de fotopolimerización (segunda etapa) se emplea el fotoiniciador 2-Hidroxí-4'-(2-hidroxí-etoxi)-2-metil-propiofenona, cuyo nombre comercial es Irgacure 2959. Este material es sensible a las longitudes de onda del ultravioleta.

Los esquemas de estas cuatro moléculas están representadas en la ilustración 8. Todas ellas fueron adquiridas de la casa *Sigma-Aldrich*.

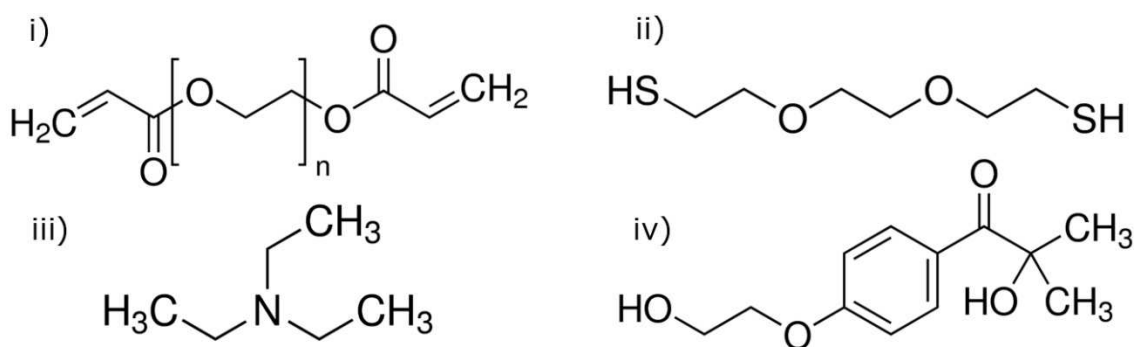


Ilustración 8. Moléculas empleadas: i) PEGDA; ii) EDDET; iii) TEA; iv) Irgacure 2959.

Para la formación de los hidrogeles se emplea agua miliQ. Es un tipo de agua ultrapura y desionizada.

II. 1. B.- Preparación de mezclas

Las cantidades de PEGDA y EDDET empleadas en cada mezcla varían dependiendo de la proporción molar que se deseara conseguir. La cantidad de TEA siempre es de 0.8 % en peso, dato tomado de la bibliografía [Nair et al., 2012]. La cantidad de fotoiniciador empleada siempre es 0.2 % en peso. Esta elección está basada en la experiencia previa del grupo de investigación. Sabemos que para sistemas con PEGDA es posible irradiar muestras de algún milímetro de espesor con una atenuación en torno al 10% de la luz ultravioleta incidente, lo que resulta en películas curadas homogéneamente en el espesor. Para formar los hidrogeles se añade siempre el peso de la mezcla en agua miliQ, obteniéndose así un hidrogel con una composición en peso 50 % agua 50 % material polimérico.

Las mezclas se preparan en recipientes de vidrio color topacio para evitar que el fotoiniciador reaccione con la luz del laboratorio y genere los radicales libres antes de lo deseado. Para asegurar la correcta mezcla de todos los componentes se hace uso de un agitador magnético pero no se emplea calor, ya que el PEGDA es sensible a él y podría degradarse. Para la primera

fase de polimerización se dejan evolucionar las mezclas 48 horas antes de añadir el agua y formar el hidrogel (ver *III. 1.- Reacción en dos etapas*). Se esperan 24 horas desde la adición del agua hasta el proceso de fotopolimerización.

II. 2.- Técnicas experimentales

II. 2. A.- FTIR

Para medir los espectros de absorción se emplea un *Spectrum 100*, de la casa *Perkin Elmer*, que posee un rango espectral que abarca desde los 4000.0 cm^{-1} hasta los 380.0 cm^{-1} . Esta máquina emplea una técnica conocida como espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR). Haciendo uso de un interferómetro de Michelson se divide en dos un haz luminoso policromático y se hace interferir entre sí. El haz resultante pasa por una serie de filtros y a través de la muestra para finalmente ser detectado en forma de interferograma (ver ilustración 9). Aplicando la transformada de Fourier al interferograma se consigue reconstruir el espectro de absorción del haz.

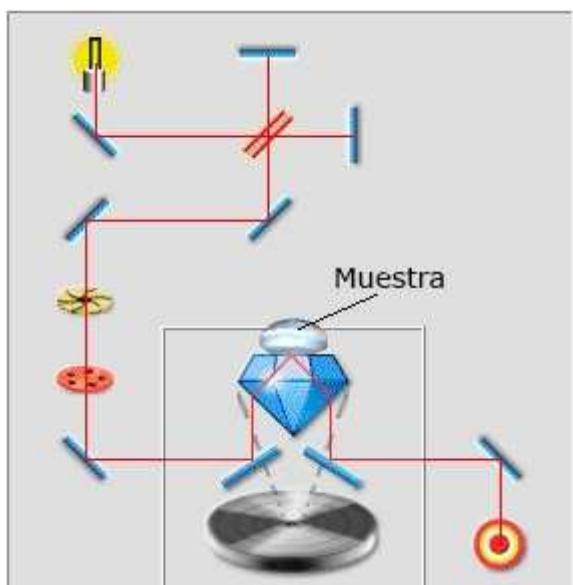


Ilustración 9. Esquema del funcionamiento del FTIR.

Antes de obtener el espectro de cada muestra siempre se toma una medida del fondo (*background*) que el software resta automáticamente. Para medir las muestras se colocan dos portas de altura conocida ($140\text{ }\mu\text{m}$) a cada lado del sensor donde se coloca la gota de material y apoyado sobre éstos un tercer porta, así se evita la evaporación parcial de la gota durante las medidas largas (más de 20 minutos). Para las medidas en intervalos cortos se realiza un promedio a 32 scans, mientras que para las medidas en intervalos de 24 horas se les realiza un promedio a 256 scans para minimizar el ruido. A los espectros tomados se les realiza las correcciones estándar. En primer lugar una corrección de línea base

(corrección del cero de la escala) para que todos ellos tengan un origen común y sean comparables. Luego se realiza una corrección ATR (Reflectancia Total Atenuada), configuración de medida empleada, debido a que la profundidad de penetración del haz en la muestra depende de la longitud de onda del propio haz. Esta es la razón por la que, antes de la corrección, se observan en el espectro absorbancias aparentes mayores para longitudes de onda mayores.

II. 2. B.- Ensayos de hinchamiento

Para los ensayos de hinchamiento se vierten los precursores de los hidrogeles en unos moldes de silicona circulares para conseguir muestras con forma de disco. Se curan las muestras

irradiándolas con una lámpara *Exfo Omnicure S2000* con potencia sobre la muestra de 10 mW/cm^2 durante 300 segundos. Tras esta irradiación el material ha fotopolimerizado convirtiéndose en una red polimérica entrecruzada con agua. Se extraen con cuidado los discos de cada material, eliminando en la medida de lo posible las rebabas formadas y se guardan en recipientes separados para ser capaces de identificarlos individualmente en todo momento. El procedimiento empleado para medir el hinchamiento es el habitual que aparece en la literatura [Nguyen et al., 2012]. Se hace una primera medida del peso de cada uno de los discos y luego se guardan en sus recipientes, a los que se añade agua hasta cubrir los discos completamente. Pasadas unas horas se realiza otra pesada, secando cuidadosamente el agua en la parte externa de los discos con un papel absorbente. El proceso se repite hasta que no cambia el peso, lo que indica que los discos no son capaces de absorber más agua.

II. 2. C.- Ensayos mecánicos

Para los ensayos de tracción se necesita que las muestras tengan unas dimensiones y forma adecuadas. Se vierte una película homogénea de precursor de hidrogel sobre un vidrio fluorinado. El fluorinado garantiza que una vez curada, la muestra no va a quedar adherida a su superficie y evitar así su posible fractura en el proceso de despegado. Para controlar el espesor de la película se colocan dos portas de espesor conocido (1 mm) a cada lado sobre el vidrio fluorinado. Apoyado sobre éstos se coloca otro vidrio que cubre toda la superficie. De esta forma se consigue que la película tenga un espesor homogéneo de 2 mm . Estas muestras se irradian con la lámpara ultravioleta durante 300 segundos con una potencia de 10 mW/cm^2 . Una vez curadas las muestras se despegan de los vidrios y se troquelan con una forma especial conocida como forma de “hueso” o “mancuerna”, típicamente empleada en estos ensayos.

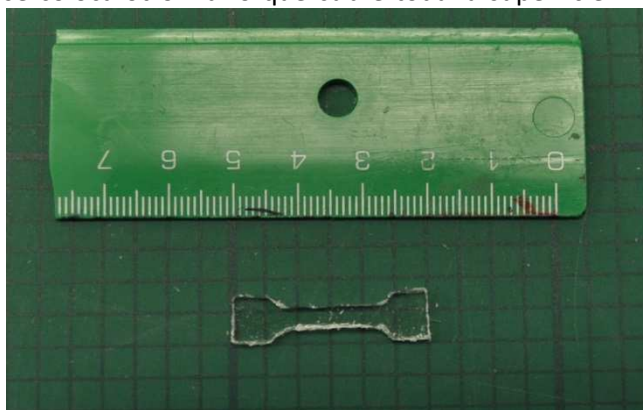


Ilustración 10. Muestra de hidrogel troquelada en forma de “hueso”.

Para hacer el ensayo de tracción se emplea una máquina *Instron MicroTester 5548* con una célula de 10 N , que limita la fuerza de tracción máxima que se podrá ejercer sobre la pieza. Se agarran las piezas troqueladas con unas mordazas especiales y se comienza a estirar a una velocidad constante de 1 mm por minuto. Un software monitoriza el ensayo guardando los valores de estiramiento y esfuerzo con una frecuencia de 125 medidas por minuto. El ensayo termina cuando, durante la tracción mecánica, la muestra se rompe.

II. 2. D.- Preparación de muestras anisótropas

Para preparar las muestras anisótropas se emplea un sistema de escritura láser. El haz del láser de 1 mm de diámetro se hace incidir sobre una plataforma *ANT130-XY* en la que se coloca una

película de espesor controlado de precursor de hidrogel. El *software* de la plataforma XY transforma un dibujo en formato *CAD* en instrucciones que la plataforma ejecuta como desplazamientos en el plano. En aquellas zonas donde el haz incide sobre la muestra el fotoiniciador genera radicales libres y se produce fotopolimerización. Por el contrario el precursor del hidrogel no se ve alterado en las zonas que el láser no irradia. De esta forma se puede generar un patrón deseado de hidrogel. Al igual que en la sección II. 2. C.- *Ensayos mecánicos* se hace uso de un vidrio fluorinado para evitar que el hidrogel se quede pegado tras el proceso de fotopolimerización.

Preparamos dos patrones distintos, uno con líneas paralelas horizontales y otro con líneas paralelas verticales (ver ilustración 11). En ambos casos las dimensiones de las muestras son 3 cm de ancho por 2 cm de alto por 2 mm de espesor. Tanto el tamaño de las varillas como el espaciado entre éstas es de 1 mm.

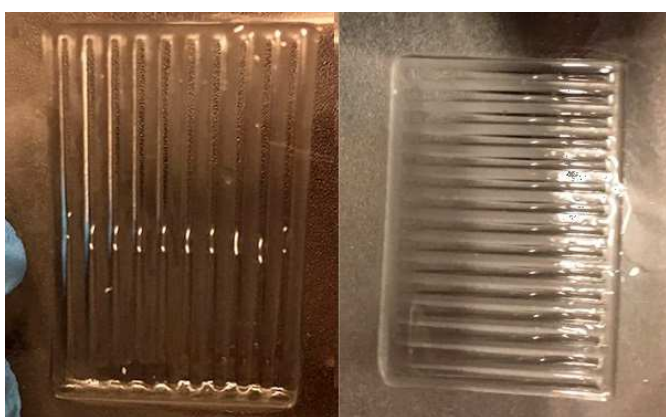


Ilustración 11. Patrones de líneas verticales (izquierda) y horizontales (derecha) generados con el sistema de escritura láser

Las muestras se dejan en una placa Petri llena de agua miliQ para evitar que se sequen. Posteriormente se vierte sobre estas muestras otro precursor de hidrogel distinto, del cual conocemos que su módulo de Young es menor y su elasticidad mayor, teniendo cuidado de que toda la parte hueca de la estructura quede uniformemente rellena y evitando que varillas contiguas queden pegadas. Se exponen las muestras rellenas a la luz de la lámpara ultravioleta a una potencia de 10 mW/cm^2 durante 300 segundos. De este modo se consiguen muestras compuestas estructuradas.

Las muestras se someten al mismo ensayo de tracción descrito en la sección II. 2. C.- *Ensayos mecánicos*, solo que esta vez las piezas no se troquelan con forma de “hueso”. También se emplean unas mordazas distintas, cuya misión es ejercer la presión de sujeción de la pieza en una mayor superficie (ver ilustración 12). A las muestras con patrón horizontal (derecha en la ilustración 11) se les cortan con una cuchilla las dos varillas verticales de los laterales, ya que su función se restringe a evitar que el precursor del hidrogel que se vierte sobre ellas quede confinado en el interior de los distintos huecos, así como facilitar la manipulación de la muestra durante el proceso. El ensayo termina cuando, durante la tracción, la muestra se rompe.

Las muestras se dejan en una placa Petri llena de agua miliQ para evitar que se sequen. Posteriormente se vierte sobre estas muestras otro precursor de hidrogel distinto, del cual conocemos que su módulo de Young es menor y su elasticidad mayor, teniendo cuidado de que toda la parte hueca de la estructura quede uniformemente rellena y evitando que varillas contiguas queden pegadas. Se exponen las muestras rellenas a la luz de la lámpara

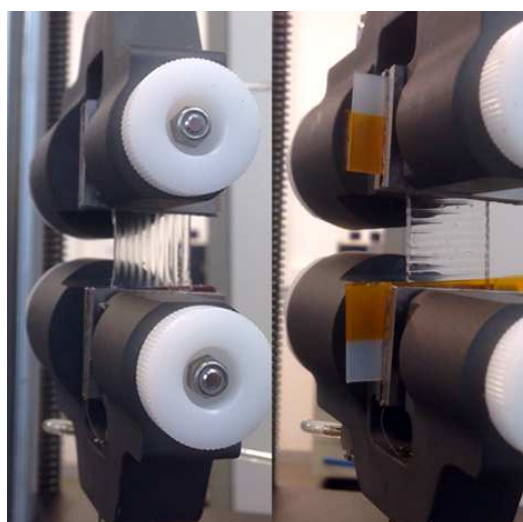


Ilustración 12. Ensayos de tracción de los dos tipos de muestras estructuradas.

III. Resultados y discusión

III. 1.- Reacción en dos etapas

En una primera parte del trabajo se llevaron a cabo estudios preliminares sobre diferentes mezclas con el fin de familiarizarnos con los materiales preparados y seleccionar el rango de estequiometrías de interés para nuestro objetivo.

III. 1. A.- Primera etapa

Lo primero que se comprueba es que la reacción de adición de Michael entre PEGDA y EDDT que corresponde a la primera etapa del proceso de polimerización en dos fases no tiene lugar de forma espontánea o es muy lenta. Se preparó una amplia gama de mezclas, cada una con distinta proporción molar entre PEGDA y EDDT (ver tabla 1). Tras 24 horas no se alcanzó a diferenciar ningún cambio visual: el líquido seguía siendo transparente y la viscosidad no había cambiado. Por esta razón se decide hacer uso de un catalizador, la trietilamina (TEA) [Nair et al., 2012]. Una vez añadido este elemento se producen cambios en la viscosidad apreciables a las pocas horas, pasando de tener fluidos convencionales a sistemas viscoelásticos e incluso sistemas que directamente no fluyen (mezclas con composiciones muy cercanas a la proporción 1: 1). Cuanto más cercana a la composición estequiométrica 1: 1, más viscoso es el sistema que se consigue.

También se observa que el orden en el que se añaden EDDT, PEGDA, TEA y fotoiniciador es aparentemente indiferente, ya que no se aprecian diferencias en las mezclas obtenidas al variar el orden de adición de estas sustancias. Sin embargo la adición del agua no se puede realizar en cualquier momento. Si se añade junto al resto de reactivos, el EDDT queda confinado en el fondo del recipiente debido a que no es miscible en agua. Se generan por tanto dos fases bien diferenciadas dentro de la mezcla, lo que imposibilita una correcta mezcla entre los distintos componentes. Por este motivo en todas las mezclas que se prepararon, el agua se añadió a las 48 horas de haber preparado la mezcla original, cuando la adición de Michel ya ha tenido lugar (ver *III. 1.- Reacción en dos etapas*).

[EDDT]	:	[PEGDA]
1	:	1
1	:	1.1
1	:	1.25
1	:	1.5
1	:	2
3	:	7
1	:	4
1	:	9

Tabla 1. Estequiometrías exploradas.

El ajuste de la fracción molar entre PEGDA y EDDT controla la longitud de las cadenas poliméricas que se formarán en la primera etapa (y por lo tanto, las propiedades mecánicas del

material final tras el entrecruzamiento en la segunda etapa). Esto puede comprenderse observando el diagrama conceptual de la ilustración 13.

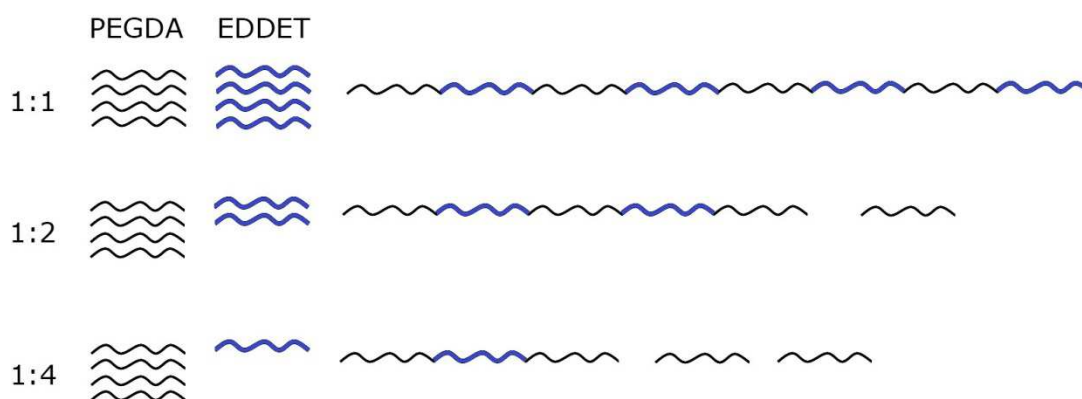


Ilustración 13. Diagrama conceptual de formación de cadenas en la primera etapa de la reacción

Si la proporción molar entre PEGDA y EDDT es 1:1, las cadenas pueden seguir creciendo hasta que se consume el tiol, y como a cada molécula de PEGDA le corresponde una de EDDT, las cadenas formadas serán las más largas. Hipotéticamente podría incluso formarse una única cadena que contuviera todo el material inicial. Cuando la proporción de EDDT disminuye, la reacción procede hasta que se consume el tiol, y las cadenas que se forman son más cortas. Por lo tanto la proporción 1:1 da las cadenas más largas, y la longitud de éstas disminuye conforme nos alejamos de esta proporción. Este hecho queda patente con la mera observación de las mezclas formadas. Aquéllas con proporciones cercanas al 1:1 son muy viscosas, tanto que tan apenas tienen movilidad (se puede poner boca abajo el bote en el que se prepara la mezcla y ésta permanece inmóvil); mientras que al alejarnos hacia proporciones con mayor cantidad de PEGDA la viscosidad disminuye.

Resultaría interesante para caracterizar los hidrogeles la medida de la distribución de pesos moleculares de las cadenas generadas en esta primera etapa. Este ensayo no pudimos realizarlo nosotros mismos por falta de medios, pero en colaboración con el profesor Søren Hvilsted perteneciente al *Danish Polymer Centre* de Copenhague estas medidas se están llevando a cabo.

Una vez esta etapa ha tenido lugar (48 horas), se añade el agua a las distintas mezclas para formar los hidrogeles. Tras 24 horas el agua se ha mezclado homogéneamente con las cadenas poliméricas formadas, obteniéndose una disolución transparente que sí fluye. Esto es un indicativo de que los polímeros formados en la primera etapa son lineales y no entrecruzados, ya que éstos últimos serían sólidos y no fluirían. Las mezclas que sí fluían antes de añadir el agua también disminuyen su viscosidad.

III. 1. B.- Segunda etapa

Para que la reacción de segunda fase se dé, en los extremos de las cadenas formadas en la primera fase debe haber grupos acrilato, (recordar el esquema de la ilustración 2). Los extremos con grupos tiol no son capaces de fotopolimerizar con otros grupos tiol, de modo

que los sistemas con exceso de tiol no pueden formar redes entrecruzadas. Por este motivo la proporción molar de PEGDA siempre se toma igual (proporción 1: 1) o mayor que la de EDDT.

Tras irradiar las mezclas se realiza un estudio cualitativo de las propiedades que presentan. La proporción 1: 1 es mecánicamente no consistente aunque muy elástica, capaz de estirarse varias veces su longitud inicial antes de romperse. Debido a su inconsistencia mecánica no se pudieron hacer ensayos mecánicos con esta estequiometría. Aquellas con un ligero exceso de acrilato (1: 1.1, 1: 1.25, 1: 1.5) son sólidos transparentes y elásticos, capaces de estirarse hasta más de un 50% antes de romperse. Por otro lado tenemos que aquellas con concentraciones más alejadas (1: 9, 1: 4, 1: 2) son sólidos translúcidos y rígidos, así como frágiles (un mínimo esfuerzo transversal los rompe) y muy poco elásticos. En cualquiera de los casos, el paso de un fluido en la primera etapa a un sólido tras la irradiación deja en evidencia que el proceso de fotopolimerización, y por lo tanto de entrecruzamiento de la red, ha tenido lugar. Posteriormente se hicieron ensayos mecánicos cuantitativos mediante tracción para caracterizar mejor estos materiales (ver III. 4.- *Ensayos mecánicos*).

III. 2.- Seguimiento de la reacción

Con los espectros obtenidos mediante la técnica de FTIR se puede realizar un seguimiento de la reacción. Se miden, como ejemplo, los espectros de los precursores de hidrogeles con proporciones estequiométricas 1: 1 y 1: 2 (ambos sin agua) para tiempos 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 y 300 minutos, así como 24 y 48 horas. Tomando como referencia el trabajo de Devatha Nair et al. la medida para tiempo cero se toma antes de añadir la trietilamina [Nair et al., 2012]. De esta forma se garantiza que la adición de Michael no está teniendo lugar durante la propia medida (puesto que como veremos, la reacción procede de manera importante en el tiempo que dura una medida). Una vez tomado este espectro se añade la TEA y comienza a contarse el tiempo.

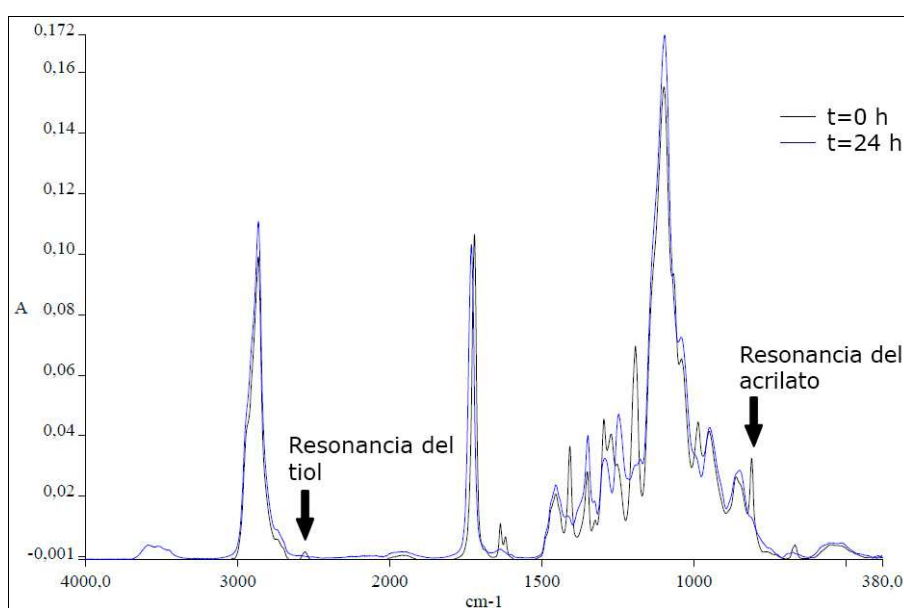


Ilustración 14. Espectro de absorción de la estequiometría 1: 1.

Para cuantificar la cinética de la reacción se calcula el área del pico correspondiente a una vibración del grupo funcional acrilato 814 cm^{-1} (marcado en la ilustración 14) para todos los espectros [Nair et al., 2012]. Para ambas estequiometrías también se hizo un estudio idéntico con el área del doble pico del doble enlace del grupo funcional acrilato (1635 cm^{-1} – 1620 cm^{-1}) obteniéndose resultados idénticos a los del pico de acrilato localizado en 814 cm^{-1} .

A medida que transcurre el tiempo, el pico de 814 cm^{-1} disminuye hasta alcanzar un estado estacionario (ver ilustración 15). El estudio del área de este pico en función del tiempo se muestra en las ilustraciones 15 y 16, donde A/A_0 es el área del pico normalizada con el área a tiempo cero. En ambos casos el área del pico de acrilato disminuye durante las primeras 5 horas y alcanza el estacionario antes de las primeras 24 horas.

Para la mezcla con estequiometría 1:1 el área disminuye hasta desaparecer completamente (los cocientes de áreas negativos muy cercanos a cero son debidos al error cometido en el cálculo de las áreas y se deben considerar como ceros). Esta área responde únicamente a la resonancia del grupo acrilato de la molécula de PEGDA en forma de monómero libre (no adicionado). Por lo tanto la disminución del pico de absorción del acrilato implica una disminución de la cantidad de grupos acrilato de PEGDA no adicionados.

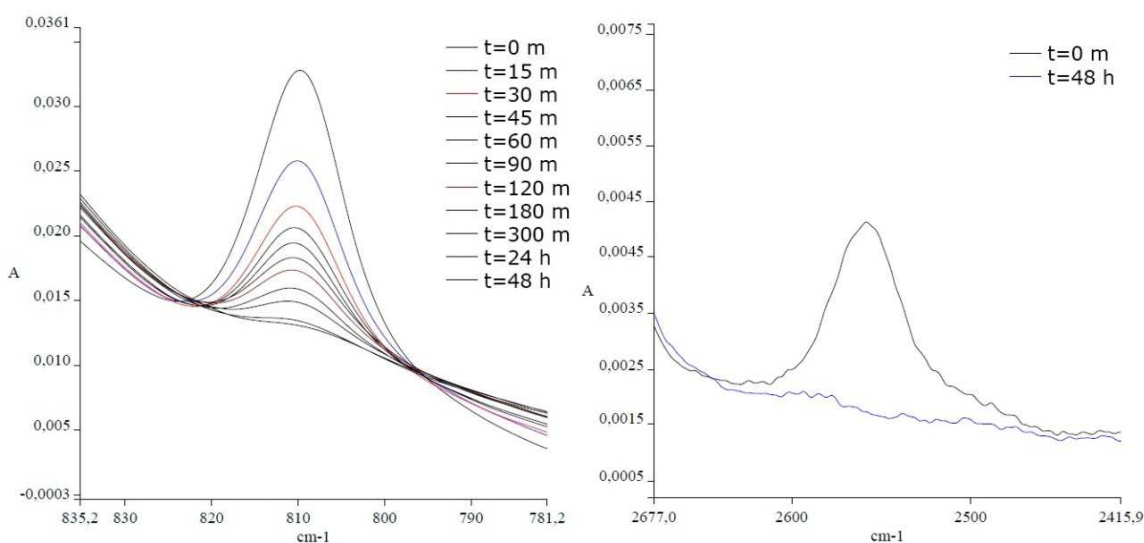


Ilustración 15. Evolución temporal del pico del grupo funcional acrilato (izquierda) y del grupo tiol (derecha) para la mezcla con estequiometría 1:1. Para el tiol se muestran sólo los espectros a tiempo cero y tras 48 horas por simplicidad.

Para el pico del grupo tiol (2570 cm^{-1}) también se observa una disminución del área conforme evoluciona el tiempo, pero es difícil cuantificarla debido a que la intensidad del pico es tan baja que queda enmascarada con el ruido de la medida (ver ilustración 15).

Estos datos nos indican que al añadir la trietilamina la reacción de adición de Michael entre moléculas de PEGDA y EDDT comienza a tener lugar, la concentración de ambas moléculas sin adicionar disminuye hasta que se consumen. Debido a que la estequiometría de la mezcla es 1:1, ambas moléculas se consumen completamente.

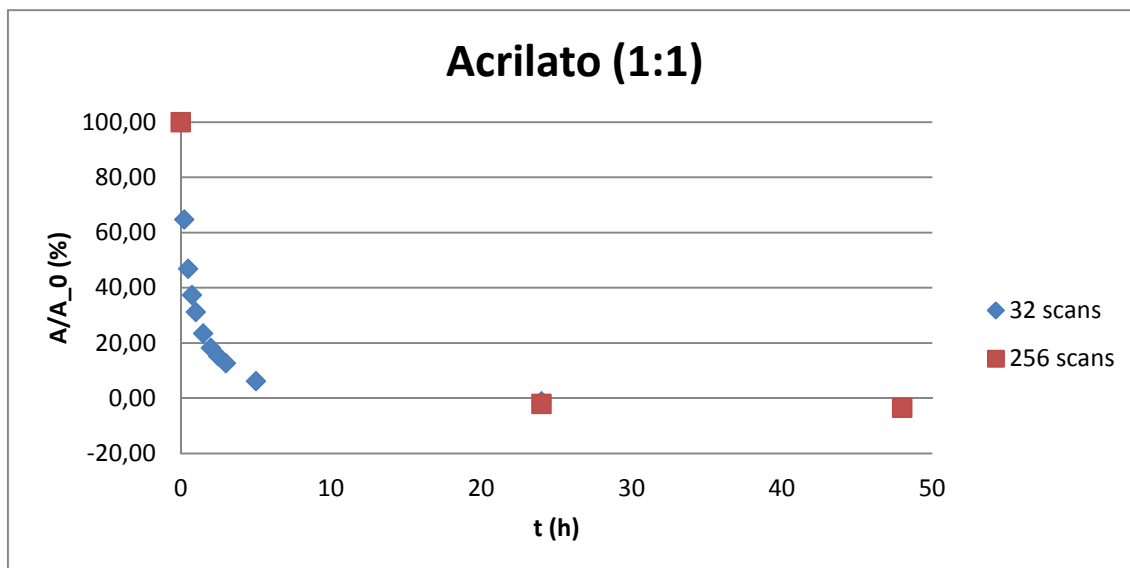


Ilustración 16. Evolución del área del pico de acrilato en la estequiometría 1: 1.

Para la mezcla con estequiometría 1:2 la evolución temporal es la misma, pero en vez de consumirse completamente el acrilato éste se reduce hasta un 45% de su concentración inicial. Debido a que por cada molécula de EDDT hay dos moléculas de PEGDA, se esperaría que la concentración de PEGDA se redujera hasta la mitad, el 50%. La diferencia entre el valor obtenido y el esperado puede deberse varios factores: un error en el cálculo del área a tiempo cero, el ruido inherente a la técnica de medida y la propia pureza de los materiales.

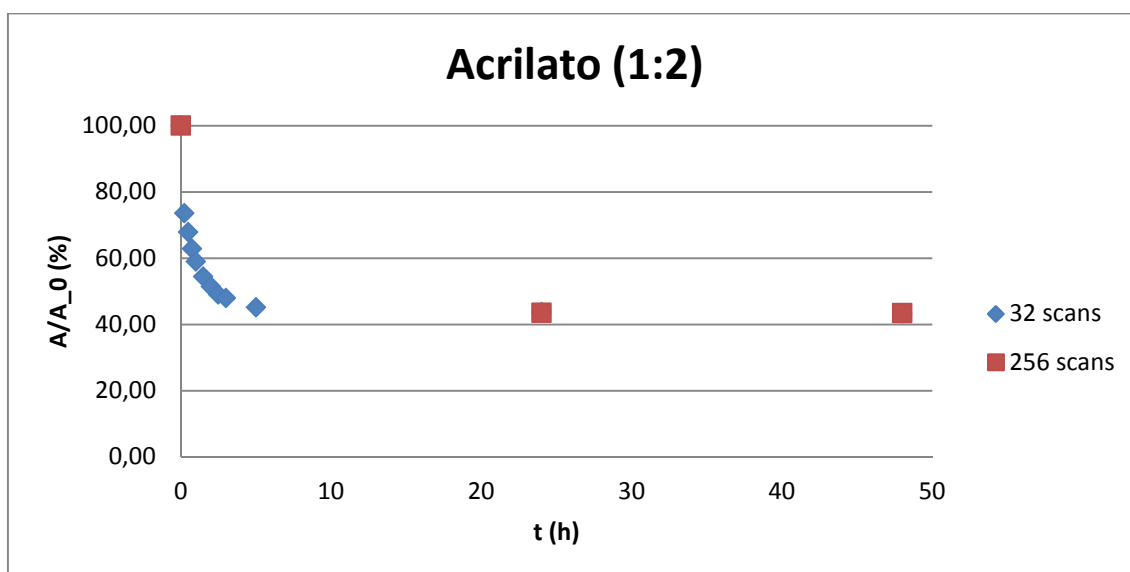


Ilustración 17. Evolución del área del pico de acrilato en la estequiometría 1: 2.

La presencia de grupos acrilato sin adicionar y en los extremos de las cadenas poliméricas formadas en la primera etapa permite la posterior fotopolimerización del material. Tras irradiar la muestra se toma un espectro del sólido formado y se comprueba que el área del pico de acrilato ha desaparecido (ver ilustración 18). Por lo tanto se puede afirmar que la fotopolimerización de los grupos acrilato (segunda etapa) ha tenido lugar y las cadenas lineales de polímeros se han entrecruzado dando lugar a una red polimérica. Este hecho ya estaba

evidenciado por el cambio de líquido a sólido del material tras la irradiación con luz ultravioleta.

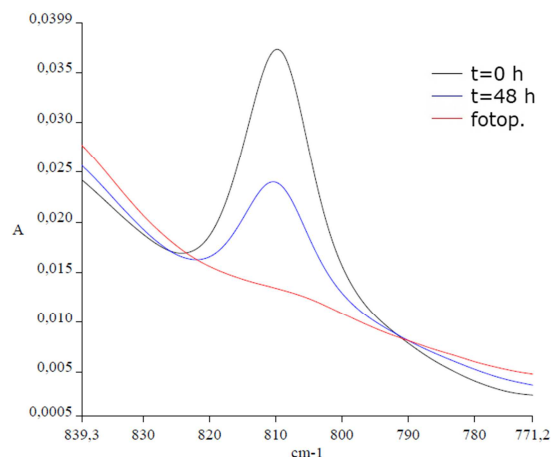


Ilustración 18. Evolución temporal del pico de absorción del grupo funcional acrilato para la estequiometría 1: 2.

III. 3.- Hinchamiento

Una vez explicada la cinética del proceso de generación de hidrogeles en dos etapas resulta de interés hacer un estudio de la capacidad de captar agua de estos materiales. La cantidad de agua que el material es capaz de captar para hincharse está relacionada con varios factores: hidrofiliicidad, densidad de entrecruzamiento, etc. [Nguyen et al., 2012; Peppas et al., 2000].



Ilustración 19. Muestra estándar para la medida del hinchamiento.

Para este ensayo se preparan hidrogeles siguiendo el procedimiento descrito en la parte experimental. Las proporciones molares entre EDDT y PEGDA escogidas son las siguientes: 1: 1.1, 1: 1.25, 1: 1.5, 1: 2 y 1: 4; todas ellas con agua. Se preparan tres discos de cada estequiometría.

Se toman pesos para tiempos 0, 3, 6, 9 y 24 horas. Normalizando los nuevos pesos con el peso inicial de cada disco y promediando entre los tres discos de misma proporción de PEGDA y EDDT se obtienen los resultados de la tabla 2.

Mezcla	m/m_0		
1:1.1	2.24	\pm	0.19
1:1.25	1.72	\pm	0.08
1:1.5	1.44	\pm	0.04
1:2	1.256	\pm	0.007
1:4	1.150	\pm	0.014

Tabla 2. Peso de los distintos hidrogeles normalizados con los pesos antes de sumergirlos en agua y promediados entre los tres discos de misma composición.

Se comprueba que aquellas mezclas con proporción más cercana al 1: 1 son las que más agua son capaces de absorber. Como se ha explicado anteriormente, la proporción 1: 1 es la que genera cadenas más largas, y la longitud de éstas disminuye al alejarnos a proporciones con mayor cantidad de PEGDA. Al poseer cadenas más largas, la distancia de entrecruzamiento entre los nodos de la red es mayor y en consecuencia la capacidad de absorber agua también crece. Por este motivo la mezcla de 1: 1.1 consigue duplicar su peso en agua y la 1: 1.25 gana más de un 70% de peso en agua. Por otro lado las mezclas 1: 2 y 1: 4 apenas absorben un 25 y un 15% respectivamente.

Si se representa el promedio de la ganancia en masa normalizada de cada serie de muestras frente al tiempo se obtiene la evolución de la absorción de las muestras (ilustración 20).

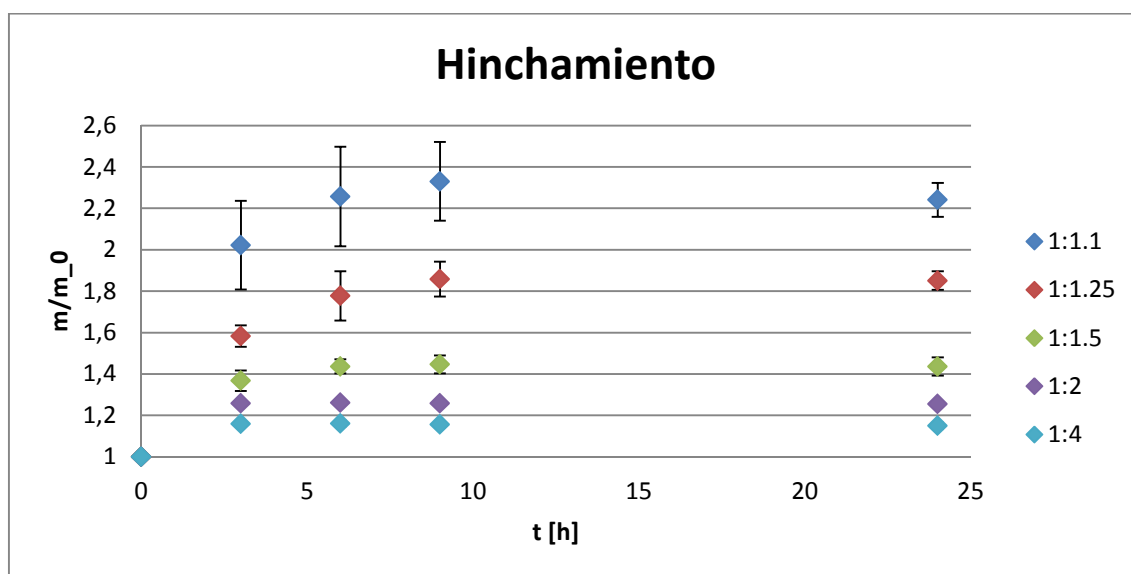


Ilustración 20. Evolución temporal del promedio del peso normalizado de los distintos hidrogeles.

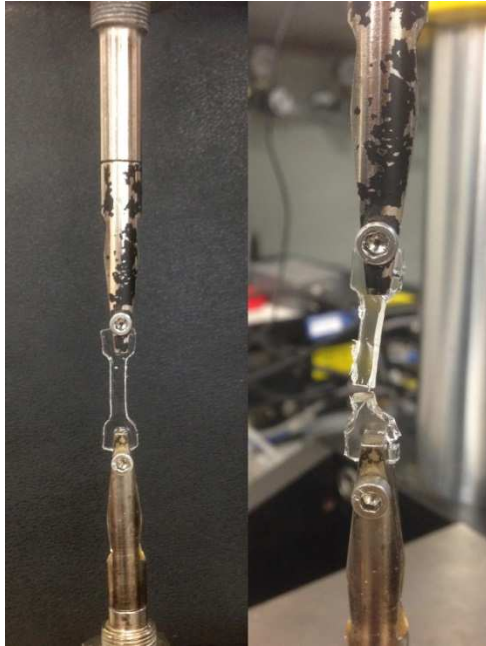
Se aprecia cómo la absorción se produce en unas pocas horas desde que las muestras se colocan en el agua. Para las muestras que menos agua son capaces de absorber, 1: 2 y 1: 4, se alcanza la saturación antes de las 3 horas. Para el resto la saturación llega aparentemente antes de las 9 horas. Los pesos medidos a las 9 y 24 horas son prácticamente los mismos y cualquier ligera desviación entra dentro de la incertidumbre de la medida. Además hay que tener en cuenta que algunas muestras presentaban rebabas que no pudieron ser eliminadas debido a la fragilidad de las muestras y que posteriormente se desprendieron durante alguno de los procesos de secado antes de medir su peso. Esta pérdida de masa se traduce en una fuente de incertidumbre en las medidas.

III. 4.- Ensayos mecánicos de hidrogeles

El ensayo de tracción sirve para cuantificar las propiedades mecánicas del material que ya se habían explorado cualitativamente en la sección de *III. 1.- Reacción en dos etapas*. Mediante

este ensayo se determinarán dos magnitudes de gran importancia en el empleo de un hidrogel como biomaterial: el módulo de Young y el estiramiento de rotura.

El ensayo se realizó para muestras con agua de concentraciones 1: 1.1, 1: 1.25, 1: 1.5, 1: 2 y 1: 4. Representando el esfuerzo ejercido en la pieza frente a su extensión se consigue lo que se conoce como diagrama de esfuerzo-deformación (ilustración 22), y de él puede extraerse la información del módulo de Young y el estiramiento de rotura.



El módulo de Young se define como

$$E = \frac{F/S}{\Delta L/L}$$

, donde F es la fuerza ejercida sobre el material, S es la sección transversal sobre la que se ejerce la fuerza y $\Delta L/L$ es el estiramiento normalizado o elongación unitaria. Escogiendo el primer tramo lineal del diagrama esfuerzo-deformación (zona elástica) y ajustando a una recta por mínimos cuadrados se obtiene un valor de la pendiente (m) que contiene información sobre el módulo de Young de la muestra.

$$E = \frac{F/S}{\Delta L/L} \Rightarrow F = \left(E \cdot \frac{S}{L}\right) \cdot \Delta L \Rightarrow m = E \cdot \frac{S}{L}$$

Ilustración 21. Muestra para el ensayo de tracción antes (izquierda) y después de alcanzar la longitud de rotura (derecha).

Basta con multiplicar la pendiente m por la longitud de la muestra y dividirla entre su sección para hallar el módulo de Young. Hay que tener en cuenta que

por longitud de la pieza se entiende solamente la distancia entre las mordazas, y por sección a la superficie perpendicular a la zona rectangular más estrecha del “hueso”.

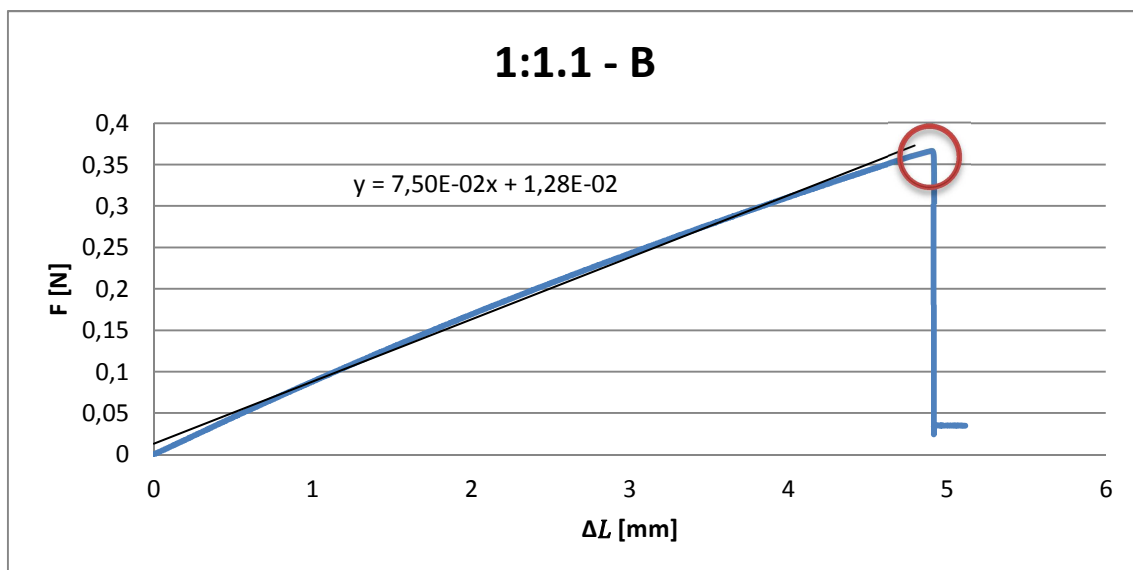


Ilustración 22. Diagrama esfuerzo-deformación para un hidrogel de composición 1: 1. 1. El ajuste a la zona elástica se realiza con los valores lineales del comienzo de la curva.

Promediando entre un mínimo de cuatro muestras de la misma composición se obtiene los módulos de Young de la tabla 3. Hay que mencionar que las piezas obtenidas de la composición 1: 4, debido a su fragilidad, se rompían fácilmente al intentar colocarlas en las mordazas, por lo que la estadística en éstas es más pobre (sólo se consiguieron medir tres muestras de esta composición). Por otra parte las piezas de composición 1: 1.1 presentaron un comportamiento casi ideal, fracturándose por la zona estrecha del hueso y no por la parte de agarre a la mordaza.

<i>Mezcla</i>	<i>E (MPa)</i>		
1: 1.1	0.200	±	0.015
1: 1.25	0.60	±	0.09
1: 1.5	1.55	±	0.10
1: 2	2.9	±	0.3
1: 4	5.0	±	0.6

Tabla 3. Módulos de Young promedio obtenidos para las distintas estequiometrías de hidrogeles.

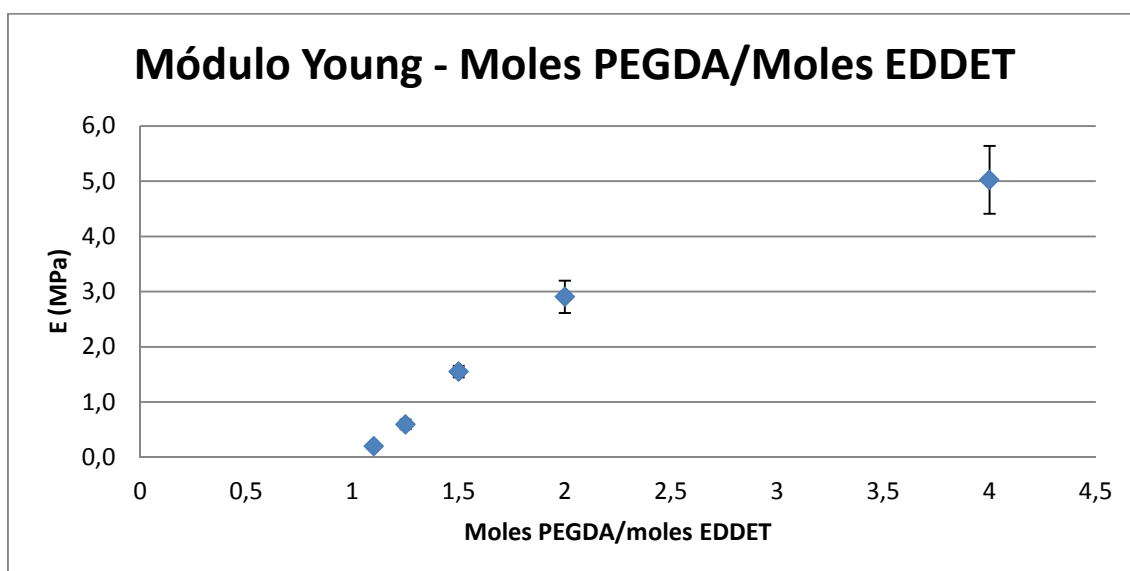


Ilustración 23. Módulo de Young promedio obtenido para cada hidrogel en función del número de moles de PEGDA por mol de EDDT.

En la representación de la ilustración 23 se puede comprobar que al aumentar la proporción de PEGDA en las mezclas el módulo de Young sigue una tendencia creciente. La mezcla con concentración 1: 2 posee un módulo elástico casi quince veces mayor que la 1: 1.1, y la 1: 4, veinticinco veces superior. Estos valores ponen en evidencia que la elasticidad del hidrogel está íntimamente relacionado con la distancia de entrecruzamiento entre nodos de la red, y por tanto con la longitud de las cadenas poliméricas que lo conforman.

La otra magnitud mecánica relevante es el estiramiento de rotura, que se define como la longitud máxima que puede alcanzar a la muestra antes de que ésta se fragmente. El estiramiento de rotura se obtiene directamente del diagrama de esfuerzo-deformación estimando el valor para el cual se produce una caída abrupta del esfuerzo aplicado (ver zona redondeada en rojo en la ilustración 22). Se normalizan los estiramientos de rotura (l_{rot}) con la

longitud inicial de cada pieza (l_o) y se promedian los valores para muestras de la misma estequiometría (tabla 4).

Debe tenerse en cuenta que la sujeción de las piezas con la mordaza fue dificultosa, ya que la fuerza del agarre debía ser lo suficientemente intensa como para que la pieza no se escurriese debido a su contenido en agua pero a su vez lo suficientemente débil como para no romper la muestra. Por este motivo algunos diagramas no fueron sencillos de leer y la estimación del estiramiento de rotura no es tan evidente como en la ilustración 22.

<i>Mezcla</i>	l_{rot}/l_o		
1: 1.1	0,18	±	0,04
1: 1.25	0,10	±	0,03
1: 1.5	0,07	±	0,03
1: 2	0,047	±	0,03
1: 4	0,02	±	0,005

Tabla 4. Estiramientos de rotura normalizados promedio obtenidos para las distintas estequiometrías de hidrogeles.

Para una mejor visualización se representan estos valores en función de la concentración molar de PEGDA de cada muestra (ilustración 24).

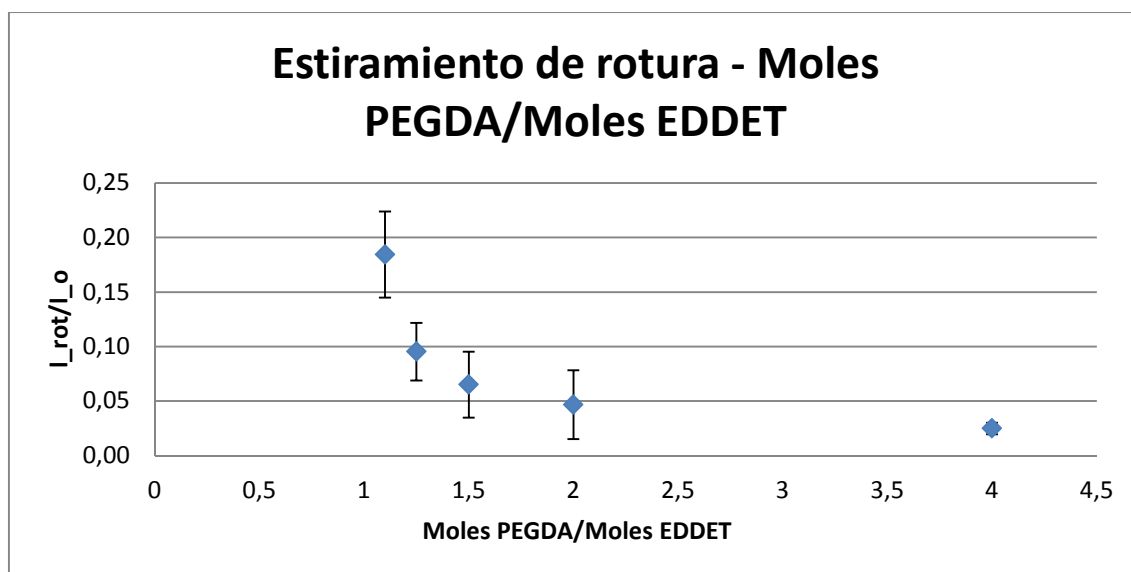


Ilustración 24. Estiramiento de rotura normalizado promedio obtenido para cada hidrogel en función del número de moles de PEGDA por mol de EDDT.

Se observa cómo aquellos materiales cuya concentración de PEGDA está más alejada de la unidad poseen un estiramiento de rotura menor, no llegando ni al 5 % de su longitud inicial para la estequiometría 1: 4. Sin embargo cuanto más nos acercamos a la composición 1: 1, mayor es la capacidad de estirarse antes de romperse de estos hidrogeles, llegando a alargarse hasta casi 20% en el caso de la mezcla de composición 1: 1.1. Se encuentra, por lo tanto, un factor 9 en el estiramiento de rotura entre el hidrogel con estequiometría más alejada de la unidad, 1: 4, y el de estequiometría más cercana, 1: 1.1.

III. 5.- Propiedades anisótropas de hidrogeles esctrutturados

La estructuración de los hidrogeles se consigue mediante la fotopolimerización radicalaria combinada con la técnica de escritura láser. Esta técnica permite la creación de estructuras con propiedades anisótropas, es decir, estructuras en las que las propiedades físicas dependen de la dirección en la que se examinen. La importancia de la obtención de anisotropía radica en que algunos tejidos biológicos presentan este tipo de comportamiento. Por lo tanto si se pretende emplear estos hidrogeles como biomateriales y en concreto en ingeniería de tejidos, las estructuras anisótropas brindan la posibilidad de imitar estos tejidos y servir como andamiaje en el crecimiento de las células [Nemir et al., 2009].

En nuestro caso se preparan una muestras que combinan dos hidrogeles con composiciones distintas, la 1: 2 que conocemos es relativamente poco elástica y posee un módulo de Young de en torno a 3 MPa; y la 1: 1.1 que es mucho más elástica y su módulo de Young es 0.2 MPa aproximadamente. Las geometrías implementadas en la estructuración se han detallado en la sección II. 2. D.- *Preparación de muestras anisótropas*. Realizando el mismo tratamiento estadístico que en el apartado III. 4.- *Ensayos mecánicos de hidrogeles* se obtienen los valores del módulo de Young de estas estructuras (ver tabla 5). Se realizaron seis ensayos de cada tipo de estructura.

Estructura	E (MPa)		
Horizontal	0.45	\pm	0.06
Vertical	0.96	\pm	0.10

Tabla 5. Módulos de Young promedio de cada tipo de estructura.

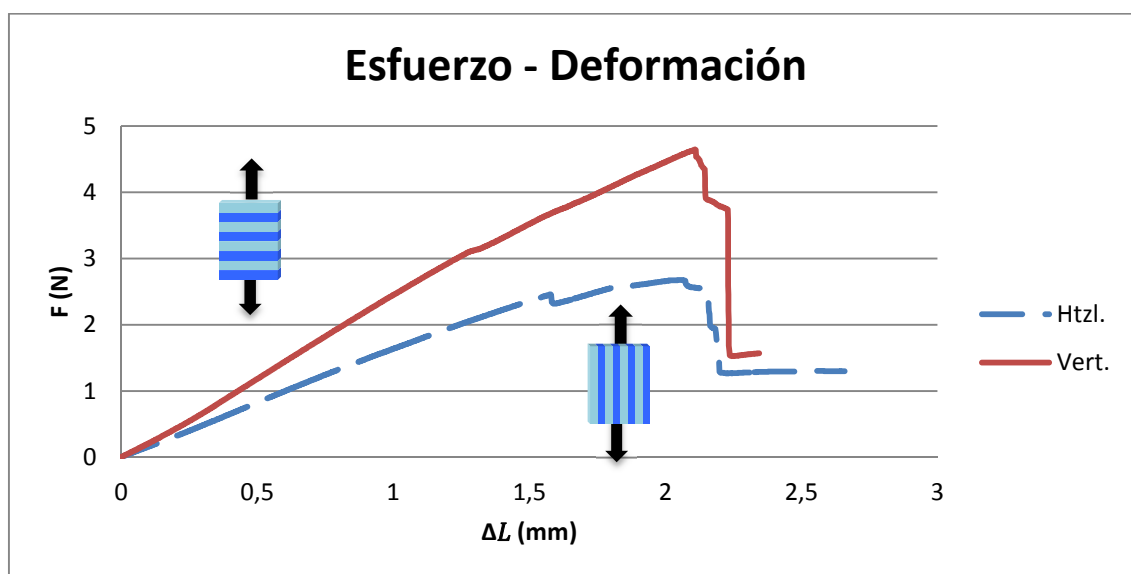


Ilustración 25. Diagrama esfuerzo-deformación para una muestra estructurada tipo horizontal (azul discontinua) y una tipo vertical (roja continua).

Para muestras cuyas varillas son paralelas a la dirección en la que se ejerce la tracción (tipo vertical) el módulo de Young obtenido es mayor que para las muestras cuyas varillas son perpendiculares a la dirección en la que se ejerce la tracción (tipo horizontal). Esto evidencia la existencia de anisotropía en estas muestras, ya que la composición de todas ellas es la misma,

y sin embargo los resultados de los ensayos de tracción dependen de en qué dirección se ejerce la fuerza sobre la muestra (ver ilustración 25).

Esta anisotropía puede entenderse cualitativamente con un sencillo modelo de muelles (ilustración 26). Las muestras tipo horizontal podrían modelizarse como un conjunto alterno de muelles de distinta constante elástica colocados en serie. La constante efectiva de ese sistema sería $1/k = \sum_n 1/k_n$. Las

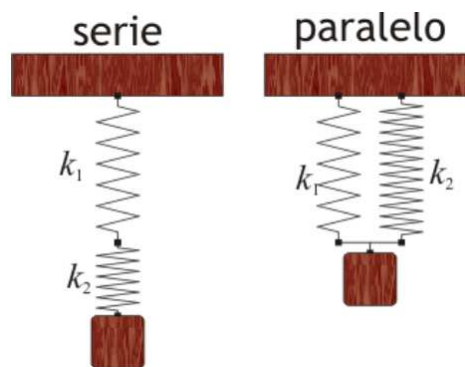


Ilustración 26. Modelo de muelles.

muestras de tipo vertical (paralelo) se pueden modelizar como un conjunto alterno de muelles de distinta constante elástica colocados en paralelo. La constante efectiva de ese sistema sería $k = \sum_n k_n$. Con este simple modelo puede comprenderse por qué una misma estructura tiene una respuesta elástica distinta dependiendo de la dirección en la que se ejerza la fuerza de tracción.

Hay que tener en cuenta que el estudio realizado es muy preliminar y existen varios aspectos que deben mejorarse. Las estructuras huecas de composición 1:2 se guardan en agua para evitar que se sequen, y hemos visto que, aunque poco, los hidrogeles con esta composición son capaces de absorber agua, por lo que se produce un hinchamiento y en consecuencia un aumento en el volumen de la estructura. A su vez las propiedades mecánicas del hidrogel 1:2 hinchado son distintas que sin hinchar, y no tenemos medidas sobre ellas.

IV. Conclusiones

Partiendo de únicamente dos monómeros (PEGDA en exceso y EDDT) y empleando una síntesis de dos etapas se ha conseguido generar hidrogeles con propiedades mecánicas muy distintas variando únicamente la estequiometría del sistema.

Esta síntesis consiste en su primera etapa en generar cadenas lineales poliméricas con grupos funcionales acrilato en los extremos mediante un mecanismo de adición de Michael entre los monómeros de PEGDA y EDDT. En la segunda etapa se consigue una red polimérica entrecruzada e hinchada con agua, un hidrogel, mediante un mecanismo de fotopolimerización. Se ha realizado un estudio de esta reacción, revelando que la primera etapa tiene lugar durante las primeras 24 horas. Asimismo se ha comprobado que tras la segunda etapa (fotopolimerización) el entrecruzamiento del sistema ha tenido lugar.

El estudio de la capacidad de hinchamiento de los distintos hidrogeles ha mostrado que aquellos que poseían cadenas lineales más largas tras la primera etapa de la reacción son los que más agua son capaces de absorber. También se observa que para las mezclas estudiadas el proceso de hinchamiento alcanza el estacionario antes de las primeras 9 horas.

Los hidrogeles formados se han sometido a ensayos de tracción para cuantificar sus propiedades mecánicas. Únicamente variando la estequiometría de la reacción se han

conseguido materiales con módulos de Young desde los 0.2 MPa hasta los 5.0 MPa . Este factor veinticinco entre los módulos de Young podría mejorarse si se hubiera estudiado alguna estequiometría más cercana a la 1: 1 que fuera mecánicamente consistente, como la 1: 1.05 o la 1: 1.02.

Mediante el uso de un sistema de escritura láser se ha conseguido obtener respuesta mecánica anisótropa mediante estructuración de materiales compuestos de dos hidrogeles distintos. La estructuración se ha llevado a cabo construyendo estructuras formadas por varillas paralelas alternas de cada tipo de hidrogel. Los módulos de Young obtenidos han sido de 0.45 MPa para esfuerzos perpendiculares a la dirección de las varillas y 0.96 MPa para esfuerzos paralelos a la dirección de las varillas.

V.- Bibliografía

[Anseth et al., 1995] Kristi S. Anseth, Christopher N. Bowman and Lisa Brannon-Peppas (1995). Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials*, 17 (1996) 1647-1657.

[Barbucci, 2009] Rolando Barbucci (2009). Hydrogels: Biological Properties and Applications. *Springer*, ISBN: 978-88-470-1103-8.

[Bounds et al., 2011] Christopher O. Bounds, Ronald Goetter, John A. Pojman and Max Vandersall (2011). Preparation and Application of Microparticles Prepared Via the Primary Amine-catalyzed Michael Addition of a Trithiol to a Triacrylate. *Journal of Polymer Science Polymer Chemistry*, DOI: 10.1002/pola.25032.

[Browning et al., 2012] Mary Beth Browning and Elizabeth Cosgriff-Hernandez (2012). Development of a Biostable Replacement for PEGDA Hydrogels. *Biomacromolecules*, DOI: 10.1021/bm201707z.

[Clapper et al., 2007] Jason D. Clapper, Jessica M. Skeie, Robert F. Mullins, C. Allan Guymon (2007). Development and characterization of photopolymerizable biodegradable materials from PEG-PLA-PEG block macromonomers. *Elsevier*, DOI: 10.1016/j.polymer.2007.08.023.

[Discher et al., 2005] Dennis E. Discher, Paul Janmey, Yu-li Wang (2005). Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate. *Science*, 10.1126/science.1116995.

[Engelmayr et al., 2008] George C. Engelmayr Jr, Mingyu Cheng, Christopher J. Bettinger, Jeffrey T. Borestein, Robert Langer and Lisa E. Freed (2008). Accordion-like honeycombs for tissue engineering of cardiac anisotropy. *Nature Materials*, DOI: 10.1038/nmat2316.

[Engler et al., 2006] Adam J. Engler, Shamik Sen, H. Lee Sweeney, and Dennis E. Discher (2006). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*, 126, 677–689.

[Green, 2010] W. Arthur Green (2010). Industrial Photoinitiators: A Technical Guide. *CRC Press: Taylor & Francis Group*, ISBN: 978-1-4398-2745-1.

[Killion et al., 2011] John A. Killion, Luke M. Geever, Declan M. Devine, James E. Kennedy, Clement L. Higginbotham (2011). Mechanical properties and thermal behaviour of PEGDMA hydrogels for potential bone regeneration application. *Journal of the Mechanical Behaviour of Biomedical Materials* 4, DOI: 10.1016/j.jmbbm.2011.04.004.

[Nair et al., 2012] Devatha P. Nair, Neil B. Cramer, John C. Gaipa, Matthew K. McBride, Emily M. Matherly, Robert R. McLeod, Robin Shandas, and Christopher N. Bowman (2012). Two-Stage Reactive Polymer Network Forming Systems. *Advanced Functional Materials*, DOI: 10.1002/adfm.201102742.

[Nemir et al., 2009] Stephanie Nemir, Heather N. Hayenga and Jennifer L. West (2009). PEGDA Hydrogels With Patterned Elasticity: Novel Tools for the Study of Cell Response to Substrate Rigidity. *Biotechnology and Bioengineering*, DOI: 10.1002/bit.22574.

[Nguyen et al., 2012] Quynhhoa T. Nguyen, Yongsung Hwang, Albert C. Chen, Shyni Varghese, Robert L. Sah (2012). Cartilage-like mechanical properties of poly (ethylene glycol)-diacrylate hydrogels. *Biomaterials*, 33 (2012) 6682-6690.

[Park et al., 2008] Seonghun Park, Steven B. Nicoll, Robert L. Mauck and Gerard A. Athesian (2008). Cartilage Mechanical Response under Dynamic Compression at Physiological Stress Levels Following Collagenase Digestion. *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 36, No. 3, March 2008, DOI: 10.1007/s10439-007-9431-6.

[Peppas et al., 2000] N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations (2000). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50 (2000) 27-46.

[Ratner et al., 2004] Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, Jack E. Lemons (2004). Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine (2nd Edition). *Elsevier Academic Press*, ISBN: 0-12-582463-7.

[Rydholm et al., 2006] Amber E. Rydholm, Kristi S. Anseth, Christopher N. Bowman (2006). Effects of neighboring sulfides and pH on ester hydrolysis in thiol-acrylate photopolymers. *Acta Materialia*, Elsevier, DOI: 10.1016/j.actbio.2006.12.001.

[Saltzman, 2004] W. Mark Saltzman (2004). Tissue Engineering: Principles for the Design of Replacement Organs and Tissues. *Oxford University Press*, ISBN: 0-19-514130-X.

[Sperling, 2006] L. H. Sperling (2006). Introduction to Physical Polymer Science. *Wiley & Sons*, ISBN: 13 978-0-471-70606-9.

[Tse et al., 2010] Justin R. Tse¹ and Adam J. Engler (2010). *Current Protocols in Cell Biology*, DOI: 10.1002/0471143030.cb1016s47.

[Yang, 2012] Ting Yang (2012). Mechanical and Swelling Properties of Hydrogels. *Wiley Periodicals*, ISBN: 978-91-7501-471-5.

[Zhu, 2012] Junmin Zhu (2012). Biomimetic Hydrogels as Scaffolds for Tissue Engineering. *Biochips & Tissue Chips*, DOI: 10.4172/2153-0777.1000e119.